Aus der Universitätskinderklinik C Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. H.-J. Bremer

Zur Pränataldiagnostik der Ahornsirupkrankheit

Dekarboxylierung von α-Ketoisokaproat in morphologisch unterschiedlichen Typen kultivierter Amnionzellen

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Gerfried Gamm

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543915_0041

Aus der Universitätskinderklinik C Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. H.-J. Bremer

Zur Pränataldiagnostik der Ahornsirupkrankheit

Dekarboxylierung von α-Ketoisokaproat in morphologisch unterschiedlichen Typen kultivierter Amnionzellen

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Gerfried Gamm

1983

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Arnold
(Prodekan)

Referent:

gez.: Prof. Dr. Wendel

Korreferent:

gez.: Priv.-Doz. Dr. Terrinde

Druck: DAFRO-Druck, Bielefeld 1

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S :

	Seite
Einleitung	1
Methodik	
1. Gewinnung von Fruchtwasser und Kultur der Amnionzellen	8
2. Vorbereitung der kultivierten Amnionzellen für den biochemischen Test	9
3. Identifizierung und Charakterisierung der Amnionzellen in Primärklonen	10
4. Messung der Dekarboxylierung von α - Ketoisokaproat in intakten kultivierten Zellen	16
5. Vergleich der spezifischen Aktivität der α - Ketoisokaproat - Dekarboxylierung verschiedener Zellarten bei Testung in Suspension und im Monolayer	18
6. Auswertung	19
Ergebnisse	20
Diskussion	29
Literaturliste	38
Zusammenfassung	45

E I N L E I T U N G :

Während der beiden zurückliegenden Jahrzehnte wurde mit der Entwicklung der Zellkultur und weiterer zytogenetischer Techniken die Voraussetzung für eine sichere Pränataldiagnostik geschaffen. Inzwischen besteht die Möglichkeit der vorgeburtlichen Diagnostik für viele genetische Krankheiten (Milunsky, 1973; Murken und Stengel - Rutkowski, 1978; Galjaard, 1980). Die Technik der Pränataldiagnostik gestattet dem Arzt den eindeutigen Nachweis, ob ein Fet mit einer schweren Erbkrankheit behaftet ist, während er früher allein auf die Berechnung des Risikos angewiesen war (Littlefield, 1973).

Ziel der Pränataldiagnostik ist, noch während der ersten Schwangerschaftshälfte das Vorliegen einer schweren genetischen Erkrankung bei einem Feten zu diagnostizieren, um durch Schwangerschaftsabbruch die Geburt eines solchen Kindes zu verhindern. In seltenen Fällen ist die Pränataldiagnostik Voraussetzung für eine Therapie des Feten bereits in utero (Ampola et al, 1975; Roth, 1982). Die Durchführung der Pränataldiagnostik ist nur dann sinnvoll, wenn bei einer Schwangerschaft ein erhöhtes Risiko für ein genau difiniertes genetisches Leiden besteht. Dieses Leiden muß

entweder durch direkte Analyse des Fruchtwassers, durch Untersuchung der kultivierten Amnionzellen, seltener durch Untersuchung des fetalen Blutes oder über die Morphologie des Feten (z. B. durch Fetoskopie) diagnostizierbar sein.

In über 90 % der Fälle erfolgt die Pränataldiagnostik aus chromosomaler Indikation (Golbus et al, 1979; Diernaes et al, 1982; Studie der Deutschen Forschungsgemeinschaft, 1982). Ganz überwiegend (in 90 % der Fälle aus dieser Gruppe) besteht ein erhöhtes Risiko für Trisomie 21 bei fortgeschrittenem mütterlichen Alter (über 35 Jahre). Die Amnionzellen werden für die fetale Karyotypanalyse kultiviert. In etwa 4 % der Fälle erfolgt die Amniozentese zur direkten Bestimmung der α - Fetoproteinkonzentration im Fruchtwasser zum Ausschluß eines Neuralrohrdefektes. Nur in etwa 1 - 3 % der Fälle erfolgt die Pränataldiagnostik wegen eines familiären Risikos für eine Stoffwechselkrankheit (Golbus et al, 1979; Diernaes et al, 1982; Studie der Deutschen Forschungsgemeinschaft, 1982; Squire et al, 1982).

Nur einige Stoffwechselkrankheiten, vorwiegend mit Störung im Abbau der organischen Säuren (Emery, 1970) wie Propion-Azidämie (Sweetman et al, 1979), Methylmalonazidurie (Morrow et al, 1977), Glutarazidurie, Typ I und II (Goodman et al, 1980) und hereditäre Tyrosinämie (Christensen et al, 1981), lassen sich direkt durch abnome Metabolitmuster des Frucht-

wassers diagnostizieren. Für die meisten erblichen Stoffwechselkrankheiten benötigt man kultivierte Amnionzellen (Galjaard, 1980), sei es zum biochemischen Nachweis des durch Mutation veränderten Genproduktes - meist durch Enzymdiagnostik - oder in neuester Zeit zur direkten Genanalyse mit Hilfe der Restriktionsendonucleasen.

Fruchtwasser, welches am günstigsten zwischen der 16. und 18. Schwangerschaftswoche durch Amniozentese gewonnen wird, enthält zwar reichlich Zellen, aber nur wenige sind metabolisch aktiv und in der Kultur vermehrungsfähig. Für biochemische Untersuchungen geeignetes Zellmaterial muß in ausreichender Menge erst in der Zellkultur gewonnen werden. Es wird deutlich, daß der zeitlimitierende Faktor bei der Pränataldiagnostik erblicher Stoffwechselkrankheiten bei der Gewinnung ausreichender Zellmengen liegt. 4 - 6 Wochen kann es dauern (bis hin zur 22. Schwangerschaftswoche), bis ein endgültiges biochemisches Ergebnis vorliegt. Für die Schwangere ergeben sich vielfach psychologische Probleme (Blumenberg et al, 1975). Eine Verkürzung der Zeitspanne zwischen Amniozentese und der Diagnosestellung läßt sich bei Beherrschung optimaler Zellkultur-Bedingungen nur noch durch Anwendung biochemischer Mikromethoden erzielen. Entsprechend wurden während der letzten Jahre erhebliche Anstrengungen unternommen, um solche Mikromethoden zu entwickeln.

Über 100 erhebliche Stoffwechselkrankheiten können inzwischen pränatal diagnostiziert werden (Galjaard, 1980). Für die

Ahornsirupkrankheit in ihrer klassischen Form ist die Notwendigkeit einer Pränataldiagnostik unbestritten.

Bei dieser autosomal rezessiv erheblichen Stoffwechselkrankheit (genannt nach dem typischen maggiartigen Ahornsirupgeruch unbehandelter Patienten) ist die oxidative Dekarboxylierung der drei verzweigtkettigen α - Ketosäuren gestört (Dancis et al, 1960; Dancis et al, 1961).

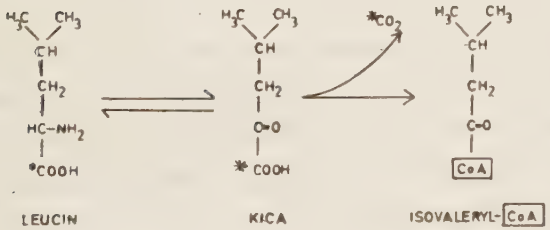

Abb. 1:

Stoffwechsel der verzweigtkettigen Aminosäuren am Beispiel von Leucin. Leucin wird intrazellulär durch reversible Transaminierung zur entsprechenden α - Ketosäure (α- Ketoisokaproat = KICA). Der weitere Abbau von KICA erfolgt intramitochondrial durch nicht-reversible oxidative Dekarboxylierung unter Freisetzung von CO_2 zum Acyl-CoA (hier Isovaleryl-CoA).

Bei Einsatz von L - [1 - ^{14}C] Leucin entsteht zunächst L - [1 - ^{14}C] KICA und dann 14 CO_2. Das entsprechende Acyl-CoA ist nicht radioaktiv markiert. Das Zeichen * gibt die Position des radioaktiv markierten C-Atoms an.

Sowohl die drei verzweigtkettigen Aminosäuren Leucin, Valin und Isoleucin (Alloisoleucin) als auch ihre Ketoanaloge α - Ketoisokaproat, α - Ketoisovalerat und α - Keto - β - methylvalerat sind aufgrund des genetischen Defekts bei unbehandelten Patienten im Blut, anderen Körperflüssigkeiten und Geweben gegenüber der Norm stark erhöht (Westall et al, 1957; Dreyfus und Prensky, 1967; Lancester et al, 1974; Jacobs et al, 1977; Langenbeck et al, 1978). Bei der klassischen Form der Ahornsirupkrankheit beträgt die Restaktivität des Dehydrogenase - Enzymkomplexes für die verzweigtkettigen Ketosäuren in Hautfibroblasten weniger als 2 % der Norm (Dancis et al, 1972). Trotz großer Fortschritte in der Elimination hoher Metabolitspiegel aus Blut und Gewebe durch Peritonialdialyse (Wendel et al, 1980; Clow et al, 1981) und Blutaustauschtransfusionen (Hammersen et al, 1978) und besserer Kenntnis der strengen diätetischen Behandlung bei dieser Erkrankung (Scriver et al, 1976), sind die Patienten weiterhin von lebensgefährlichen Krisen mit hohen Blut- und Gewebespiegeln der verzweigtkettigen Metabolite bedroht. Solche treten im Rahmen von Infektionen und selbst leichteren interkurrenten Erkrankungen mit den sie begleitenden katabolen Zuständen auf. Die Metaboliten verursachen akute Störungen und chronische Schäden im Bereich des Zentralnervensystems

(Gaull et al, 1975). Unerkannt und unbehandelt führt die klassische Form der Ahornsirupkrankheit bereits in der Neugeborenenperiode zu schweren neurologischen Schäden und zum Tod. Meist liegen bereits irreversible neurologische Schäden zum Zeitpunkt der Diagnosestellung durch das Neugeborenenscreening vor.

Die Pränataldiagnostik ist nicht gerechtfertigt bei den leichteren Varianten der Ahornsirupkrankheit. Bei diesen leichteren Formen beträgt die Restaktivität für die oxidative Dekarboxylierung der verzweigtkettigen Ketosäuren in Hautbibroblasten mehr als 2 % der Norm (Dancis et al, 1972).

Ziel der vorliegenden Untersuchung ist es, eine vorhandene Mikromethode zur Pränataldiagnostik der Ahornsirupkrankheit (Wendel et al, 1973) methodisch zu verfeinern und auf ihre Sicherheit zu überprüfen. Eine Verminderung der Zahl der kultivierten Zellen im Test birgt die Gefahr wachsender Ungenauigkeit in sich, im Falle der kultivierten Amnionzellen auch ganz besonders deshalb, weil sie in morphologisch unterschiedlichen Typen vorkommen. So können sich Amnionzellkulturen
1.) durch die Anzahl sich bildender Klone und
2.) durch den vorherrschenden Zelltyp erheblich unterscheiden.
Bereits früher wurde berichtet (Gerbie et al, 1972), daß morphologisch unterschiedliche Amnionzellen aus derselben Kultur große Aktivitätsunterschiede einzelner Enzyme aufwiesen, so daß bei Überwiegen eines Zelltyps in der Kultur durchaus die Gefahr einer fehlerhaften Diagnose besteht. Um diese Ge-

fahr für die Ahornsirupkrankheit abschätzen zu können, wurde die Aktivität der oxidativen Dekarboxylierung von α - Ketoisokaproat in den verschiedenen Amnionzellen bestimmt.

Außerdem wurde die Überlegenheit einer Mikromethode (Wendel et al, 1973) speziell für die Bestimmung von Enzymaktivitäten in Amnionzellen aus Primär- und frühen Subkulturen gegenüber einer herkömmlichen Methode (Dancis et al, 1973) aufgezeigt.

Der bei der Ahornsirupkrankheit defekte Enzymschritt läßt sich in intakten Fibroblasten und Amnionzellen durch Messung des freigesetzten radioaktiven CO_2 bei Inkubation der Zellen mit L - [1 - ^{14}C] - Leucin (initiales Substrat) quantifizieren. Bei Einsatz von L - [1 - ^{14}C] - Leucin entsteht durch reversible Transaminierung intrazellulär [1 - ^{14}C] - α - Ketoisokaproat, welches unter Freisetzung von $^{14}CO_2$ enzymatisch weiter abgebaut wird. Zellen von Patienten mit Ahornsirupkrankheit setzen deutlich gegenüber der Norm reduzierte Mengen von CO_2 frei.

M E T H O D I K :

1. Gewinnung von Fruchtwasser und Kultur der Amnionzellen

Die untersuchten Amnionzellen (normale Kontrollen) stammten von schwangeren Frauen in fortgeschrittenem Alter (über 37 Jahre). Die Kultur der Amnionzellen erfolgte zur Karyotypanalyse. Die Amniozentese wurde in der 16. und 17. Schwangerschaftswoche durchgeführt. Nach Anreicherung der Zellen durch Zentrifugation wurden die Kulturen in Falconflaschen und zum Teil in Petrischalen (Ø 23 mm) angelegt. Zur Kultur wurde Ham's F - 10 - Kulturmedium verwendet, das mit 20 % fetalem Kälberserum und mit Antibiotika (Flow, England) angereichert war. Die Inkubation dieser Primärkulturen erfolgte bei 37° C in einer feuchten Atmosphäre aus 95 % Luft und 5 % CO_2.

Das Medium der Primärkulturen wurde alle 4 Tage erneuert. Im allgemeinen waren zwischen dem 9. und 14. Tag nach Kulturbeginn Primärklone mit einer ausreichenden Zellzahl vorhanden.

Eine Zellinie stammte von einer Schwangerschaft mit Risiko für die klassische Form der Ahornsirupkrankheit. Hier hat die biochemische Untersuchung der Zellen den Hinweis auf einen homzygoten Genträger für die Ahornsirupkrankheit er-

geben (wurde später in kultivierten Fibroblasten der fetalen Haut bestätigt).

Kultivierte Hautfibroblasten stammten von Kindern ohne nachweisbare Störung im Amnionsäurestoffwechsel sowie von Kindern mit der klassischen Form der Ahornsirupkrankheit. Sie wurden nach wenigen Kulturpassagen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt und hatten nach Auftauen erneut 2 - 3 Kulturpassagen durchlaufen.

2. Vorbereitung der kultivierten Amnionzellen für den biochemischen Test

Nach Entfernung des Kulturmediums wurden jeweils 5 - 6 ml einer Trypsin - EDTA - Lösung (in gepufferter 0,9 %iger Kochsalzlösung; Flow, England) unter Sicht auf einzelne Primärklone der Amnionzellkultur gegeben.
Nach Ablösen der Zellen von der Unterlage (nach 5 Minuten bei 37° C) wurden jeweils die zu einem Klon gehörenden Zellen möglichst vollständig mit einer sehr fein ausgezogenen Pasteurpipette mittels eines Mikromanipulators aus der Petrischale entnommen. Das auf diese Weise gewonnene Zellmaterial eines Klons wurde in 400 µl eines Trypsin/Kulturmedium - Gemisches aufgenommen und zu gleichen Teilen in zwei oder mehr Vertiefungen einer Terasaki - Mikrotestplatte (Mikrotest II Tissue - Culture - Plate, Falcon, USA)

überführt. Etwa 30 Minuten nach Gabe der Zellen auf die Mikrotestplatten hatten sich diese am Boden abgesetzt. Das Trypsin/Medium - Gemisch wurde vorsichtig abpipettiert und durch 200 µl je Vertiefung eines frischen Kulturmediums (Ham's F - 10) ersetzt. Die Testplatten wurden dann für 36 Stunden in einer feuchten Kammer mit 95 % Luft und 5 % CO_2 inkubiert. Nach 18 Stunden wurde das Medium nochmals erneuert.

3. Identifizierung und Charakterisierung der Amnionzellen in Primärklonen

Amnionzellen zeigen in Primär- und frühen Subkulturen klones Wachstum. Nach der Literatur kommen in Primärkulturen (Primärklonen) zwischen 3 und 6 morphologisch unterschiedliche Amnionzelltypen vor (Hoehn et al, 1974; Sutherland et al, 1974; van der Veer et al, 1978). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Klassifizierung der Amnionzellen nach vorausgegangener Übung unter Verwendung der Kriterien von Hoehn et al, 1974.

Die 3 Zelltypen haben folgende Charakteristika:

a) F - Zellen (fibroblastenähnliche, fibroblastoide Zellen)

Diese haben vorwiegend Spindelform und wachsen bei Konfluenz in streng parallelen Reihen. Sie lassen sich gut subkultivieren und haben ein hohes Wachstumspotential. Ihre Wachstumscharakteristik ähnelt stark den Zellen aus fetaler Haut.

b) E - Zellen (epitheloide Zellen)

Diese wachsen pflastersteinartig in engem Zellkontakt und lassen sich durch Trypsin relativ schlecht von der Oberfläche der Kulturgefäße lösen. Nach Subkultivierung wachsen sie schlecht an und haben eine geringe Wachstumspotenz.

c) AF - Zellen (amniotic fluid cells) Hoehn et al, 1974

Häufigster Zelltyp in Amnionzellkulturen und ist spezifisch für diese. Die Zellen sind pleomorph, sie haben unregelmäßige, zum Teil gekräuselte Zellgrenzen. Klone mit diesen Zellen enthalten wenig bipolare, spindelförmige Zellen und relativ viele Zellen mit großen, irregulären Zellkernen, zum Teil sind sie mehrkernig. Die Zellen bilden bei Wachstum in Konfluenz weniger parallele Reihen als F - Zellen. Bei Alterung werden sie in ihrer Morphologie den F - Zellen ähnlich. Die Wachstumspotenz der AF - Zellen liegt zwischen der von E - und F - Zellen.

Typische Beispiele für die einzelnen Zelltypen in Primär-

klonen von Amnionzellkulturen sind in Abbildung 2 bis 4 gezeigt. Es werden Zellen in dichter Konfluenz aus den Zentren entsprechender Primärklone (Vergrößerung 20fach) gezeigt sowie ihre typische Morphologie am Rande entsprechender Klone (Vergrößerung 63fach).

Abb. 2 a

Abb. 2 b

Abb. 2: Amnionzellen vom F - Zelltyp in der Zellkultur 17 Tage nach Kulturbeginn.
Abb. 2 a zeigt die Mitte eines Klons (Vergrößerung 13fach)
Abb. 2 b zeigt Zellen am Rande eines Klons (Vergrl. 20fach).

Abb. 3 a

Abb. 3 b

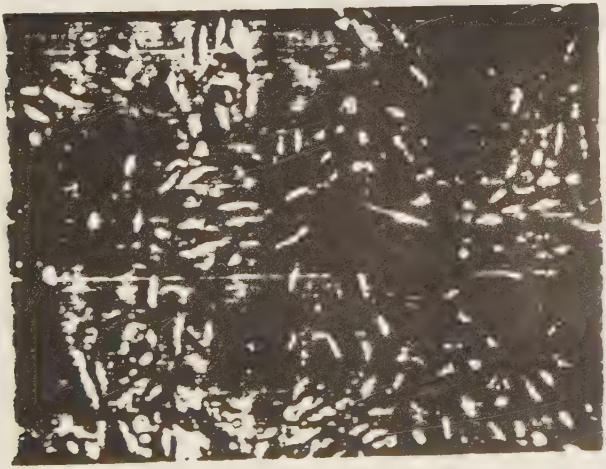

Abb. 3: Amnionzellen vom E - Zelltyp in der Zellkultur 23 Tage nach Kulturbeginn.
Abb. 3 a zeigt Zellen in der Klonmitte (Vergrößerung 63fach)
Abb. 3 b zeigt Zellen vom Klonrand (Vergrößerung 63fach)

Abb. 4 a

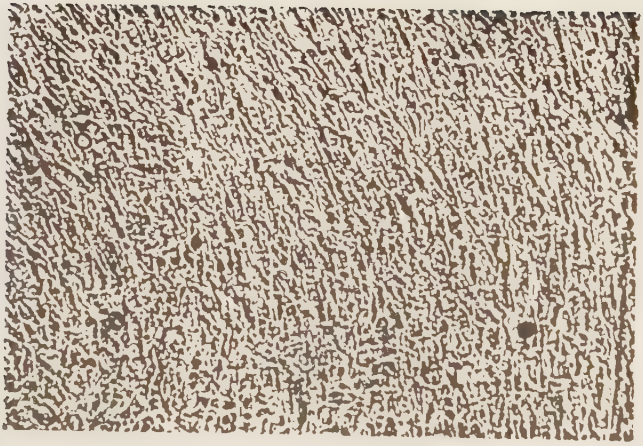

Abb. 4 b

Abb. 4: Amnionzellen vom AF - Zelltyp in einer Zellkultur 16 Tage nach Kulturbeginn.

Abb. 4 a zeigt die Klonmitte (Vergrößerung 20fach)

Abb. 4 b zeigt Zellen am Rande eines Klons (Vergrößerung 63fach)

4. Messung der Dekarboxylierung von α- Ketoisokaproat in intakten kultivierten Zellen

Vor der biochemischen Testung der auf Mikrotestplatten im Monolayer wachsenden intakten Zellen (Fibroblasten oder Amnionzellen) wurde das Kulturmedium entfernt und der am Boden haftende Zellmonolayer mehrfach mit warmer physiologischer Kochsalzlösung gespült. Anschließend wurde auf den auch weiterhin am Boden der Plattenvertiefungen haftenden Monolayer jeweils 100 /ul eines frisch angesetzten Inkubationsgemisches gegeben. Das Inkubationsgemisch bestand aus mit Phosphat - gepuffertem 0,9 %igen Kochsalz (PBS, Dulbecco Modifikation) und 1 % Glukose, welches radioaktives Leucin (7 nmol unmarkiertes L - Leucin und 3 nmol ± 10 % L - [1 ^{14}C] - Leucin (spezifische Radioaktivität: 58 mCi/mmol, bezogen von Amersham, England) in einer Konzentration von 0,1 mmol/l enthielt. Jede Plattenvertiefung wurde dann mit einem in 3,5 normaler Natronlauge getränkten Glasfiberplättchen (Ø 10 mm, Millipore, Neu Isenburg) abgedeckt, und die Platte wurde fest verschlossen für 4 Stunden in einer feuchten Kammer bei 37° C inkubiert. Nach Inkubationsende wurden die zur Abdeckung benutzten Glasfiberplättchen direkt in Sintillationsgefäße mit jeweils 10 ml Sintillationsflüssigkeit (1,6 l Toluol, 0,8 l Äthanol (96 %ig), 9,6 g 2,5 - Diphenyloxazol (PPO) und 0,24 g 1,4 - bis (- 5 - Phenyloxazolyl - 2)- benzene

(POPOP)) überführt. Das während der Inkubation durch Dekarboxylierung des Substrats freigesetzte Kohlendioxyd wurde von den alkalischen Glasfiberplättchen quantitativ absorbiert. Nach einer Latenz von 12 Stunden bei 4° C wurde die von den Plättchen aufgenommene Radioaktivität in einem Sintillationsspektrometer (Tricarb, Fa. Packard) gemessen. Zur Messung der spontanen Dekarboxylierung des eingesetzten Substrats dienten Plattenvertiefungen, die nur Inkubationsgemisch ohne Zellen enthielten. Typischerweise wurde im Leeransatz eine Radioaktivität von 40 - 60 cpm freigesetzt, entsprechend einer nichtenzymatischen Substratdegradation von 0,4 - 0,7 pmol. Der mit jeder Versuchsreihe von Zellen gleichzeitig mitbestimmte Leerwert wurde jeweils von der gesamten, durch Zellen freigesetzten Radioaktivität abgezogen.

Nach Inkubationsende wurde die Menge des in der Plattenvertiefung enthaltene "Zellprotein" nach einer modifizierten Methode nach Lowry (Lowry et al, 1951) bestimmt. Eichkurven wurden mit Rinderalbumin in Konzentrationen von 10 - 150 /ug/ml, gelöst im Puffer des Testansatzes, erstellt. Die untere sichere Nachweisgrenze für das Zellprotein lag nach dieser Methode bei 10 /ug/ml (= 1 /ug im Einzeltest).

Die Dekarboxylierungsrate von α - Ketoisokaproat bei Einsatz von Leucin als Initialsubstrat wurde als freige-

setztes CO_2 in pmol, bezogen auf /ug Zellprotein und eine Inkubationszeit von 3 Stunden, angegeben. Die angegebenen Werte sind jeweils Mittelwerte aus 3 Parallelbestimmungen.

Bei der Erstellung der Kinetik für die Dekarboxylierung von α- Ketoisokaproat in intakten Zellen, mit Leucin als Intialsubstrat, (Dekarboxylierungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration) wurden konstant 3 nmol $_L$ - $\left[1\ ^{14}C\right]$ - Leucin mit unterschiedlichen Mengen von nicht radioaktivem L - Leucin kombiniert.

5. Vergleich der spezifischen Aktivität der α- Ketoisokaproat - Dekarboxylierung verschiedener Zellarten bei Testung in Suspension und im Monolayer

In einer Gruppe von Experimenten wurde die spezifische Aktivität der α - Ketoisokaproat - Dekarboxylierung von Fibroblasten und kultivierten Amnionzellen, jeweils gemessen in Suspension und im Monolayer, verglichen. Die benutzten Zellen waren kultivierte Fibroblasten aus der gleichen Passage sowie gemischte Amnionzellen aller drei Typen aus der gleichen Primärkultur, die jeweils in parallel angesetzten und identisch behandelten Kulturflaschen gezüchtet worden waren. Die zur Testung im Monolayer bestimmten Zellen wurden 24 Stunden vor Testbeginn trypsiniert und in die Vertiefungen von Mikrotestplatten gegeben. Sowohl die Mengen

an Zellprotein, die zur Bildung des Zellrasens in die Mikrotestplatte gegeben wurden (A), als auch jene, die 24 Stunden später tatsächlich im gespülten Zellmonolayer vor Testbeginn vorlagen (B), wurden bestimmt. In die Tests mit suspendierten Zellen wurden etwa gleiche Mengen an Zellprotein wie zur Herstellung des Zellrases (A) eingesetzt. In den unterschiedlich vorbereiteten Proben wurde die Dekarboxylierung von α - Ketoisokaproat simultan mit identischem Testansatz untersucht.

6. Auswertung

Die Ergebnisse wurden nach den üblichen Methoden statistisch ausgewertet. Zwei Gruppenvergleiche wurden nach dem t - Test durchgeführt.

E R G E B N I S S E :

In der vorliegenden Arbeit wurde die Dekarboxylierung von α - Ketoisokaproat in inatakten kultivierten Zellen untersucht. Als initiales Substrat für diese Reaktion wurde den Zellen die analoge [1 - ^{14}C] - markierte Aminosäure L - Leucin angeboten.

Zunächst wurde die Abhängigkeit der Dekarboxylierungsgeschwindigkeit von der Menge des eingesetzten Zellproteins und von der Inkubationsdauer untersucht.

Die freigesetzte Menge an CO_2 war linear mit dem Zellprotein korreliert, und zwar über einen untersuchten Bereich von 0,9 - 10 /ug (Abb. 5).

Abb. 5

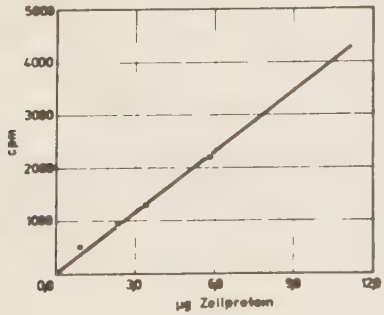

Abb. 5:
Dekarboxylierung von α - Ketoisokaproat (Leucin als Ausgangssubstrat) in kultivierten Amnionzellen in Abhängigkeit vom Zellprotein. (Substratkonzentration: 0,1 mmol/l L - Leucin. Inkubationsdauer 4 Stunden) Angabe des gemessenen 14 CO_2 in Cpm.

In Abb. 6 ist der zeitliche Verlauf der Dekarboxylierung von α - Ketoisokaproat durch kultivierte Hautfibroblasten und Amnionzellen dargestellt. Während der ersten 90 Minuten der Inkubationsdauer bestand keine lineare Beziehung zur Zeit. Wurde der Reaktionsbeginn jedoch durch Extrapolation auf die 60. Minute festgelegt, so bestand über weitere 3 - 4 Stunden eine lineare Beziehung zur Zeit. Bei diesem Vorgehen reichte die Erstellung eines Meßpunktes z. B. nach 1stündiger Inkubation aus. Entsprechend wurde später bei allen Aktivitätsangaben die reale Inkubationsdauer um eine Stunde verkürzt angegeben.

Abb. 6

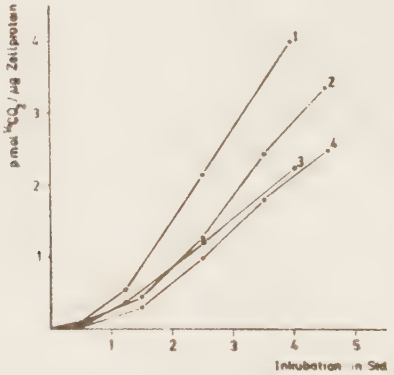

Abb. 6:

Zeitlicher Verlauf der Dekarboxylierung von α - Ketoisokaproat (Ausgangssubstrat: Leucin) in kultivierten Fibroblasten und Amnionzellen. 1, 2, 4: Amnionzellen; 3: Fibroblasten. Substratkonzentration: 0,1 mmol/l Leucin.

Um die Dekarboxylierungsrate von α- Ketoisokaproat auch bei Einsatz geringer Zellmengen in dem Test messen zu können, war eine hohe Testempfindlichkeit erforderlich. Sie wurde durch eine hohe spezifische Radioaktivität des Substrats ermöglicht. Die hohe spezifische Radioaktivität (58 mCi/mmol) des käuflichen L - [1 - ^{14}C] - Leucin sollte nur wenig durch Zumischen nichtmarkierten Substrats gesenkt werden, wobei allerdings die Leucin - Gesamtkonzentration im Test auch relativ gering blieb. Zur Ermittlung des Optimums der Substratkonzentration für die Reaktion wurde die Dekarboxylierungsgeschwindigkeit verschiedener Fibroblasten- und Amnionzellinien in Abhängigkeit von der Leucin - Konzentration untersucht (Abb. 7). Es zeigte sich, daß bei einer Leucin - Konzentration von 0,1 mmol/l die Dekarboxylierungsrate etwa 80 % des Optimums betrug. Diese Konzentration erschien, obwohl nicht im Sättigungsbereich des Substrats, geeignet für die gewünschte hohe Testempfindlichkeit. Die apparente Michaelis - Menten - Konstante für diese komplexe Reaktion (Dekarboxylierung von α- Ketoisokaproat, gemessen mit Leucin als Initialsubstrat in intakten Zellen im Monolayer) betrug etwa 0,05 mmol/l.

Abb. 7

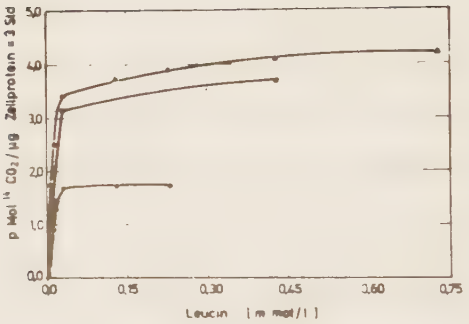

Abb. 7:
Rate der Dekarboxylierung (pmol $^{14}CO_2$/ µg Zellprotein x 3 Stunden) von α- Ketoisokaproat in Abhängigkeit von der Leucinkonzentration im Test. ▲, ● : verschiedene Fibroblastenlinien; ■ kultivierte Amnionzellen.

Abb. 8

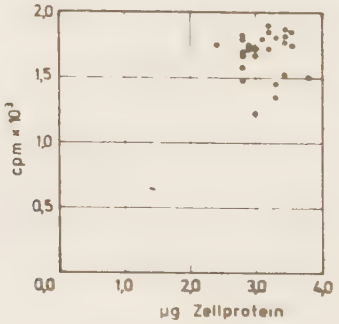

Abb. 8:
Einzelwerte der Dekarboxylierung von α - Ketoisokaproat aus 26 Einzeltests mit kultivierten Fibroblasten einer Linie unter identischen Testbedingungen.

Abb. 8 zeigt die Streubreite der Daten der Dekarboxylierung von α -Ketoisokaproat aus 26 Einzeltests, die mit Zellen einer Fibroblastenlinie unter identischen Testbedingungen durchgeführt wurden. Die Substratkonzentration betrug 0,1 mmol/l. Der Mittelwert betrug 546,3 $\pm$ 77,5 cpm/ /ug Zellprotein. Somit betrug der Variationskoeffizient (Standardabweichung als % des Mittelwertes (S.D./X)) 14 %.

Dekarboxylierung von α - Ketoisokaproat in morphologisch unterschiedlichen Amnionzellen

Die untersuchten kultivierten Amnionzellen stammten aus 34 zufällig unter dem Mikroskop aufgesuchten Primärklonen aus insgesamt 12 Amnionzellkulturen. In 66 % wurden die Klone aus den typischen AF - Zellen, in 25 % aus epitheloiden Zellen und in 9 % aus fibroblastoiden Zellen gebildet.

Die spezifische Aktivität der α - Ketoisokaproat - Dekarboxylierung der einzelnen Zelltypen ist in Tab. 1 dargestellt. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Zelltypen sind nicht signifikant ($p > 0,05$).

Tab. 1:

Spezifische Aktivität der α - Ketoisokaproat - Dekarboxylierung verschiedener Amnionzelltypen.

Zelltyp	$\bar{X} \pm$ S. D. (pmol CO_2/ /ug Zellprotein x 3 Stunden)
AF - Zellen (N = 25)	3,06 ± 1,3
F - Zellen (N = 17)	2,66 ± 1,4
E - Zellen (N = 8)	2,21 ± 0,9

Mittelwert und Standardabweichung ($\bar{X} \pm$ S. D.) für die durch N angegebene Anzahl der Tests. Jeder Test wurde in dreifacher Anordnung durchgeführt.

Abb. 9 zeigt die Dekarboxylierungsraten einzelner Zellinien als Funktion der in den Test eingesetzten Menge an Zellprotein. Aus dieser Abbildung ist zu entnehmen, daß verläßliche Daten für die α - Ketoisokaproat - Dekarboxylierung der einzelnen Amnionzelltypen bereits beim Einsatz von nur 1 - 3 /ug Zellprotein (= 3000 - 10.000 Zellen) gemessen wurden. Jede untersuchte Amnionzellinie, unabhängig vom Zelltyp des Primärklons, konnte aufgrund ihrer spezifischen Dekarboxylierungsrate für α - Ketoisokaproat eindeutig von

Fibroblasten von Patienten mit klassischer Form der Ahornsirupkrankheit sowie von einer Amnionzellinie von einem Feten mit homozygotem Status für die Ahornsirupkrankheit abgegrenzt werden.

Abb. 9

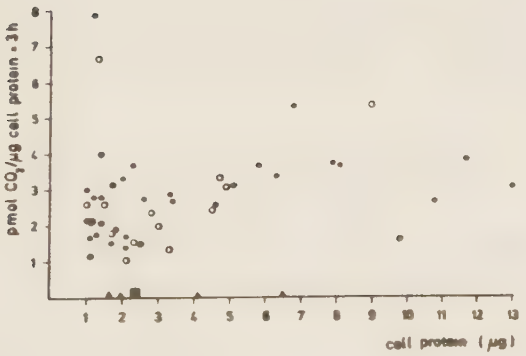

Abb. 9:

Spezifische Aktivitäten der Dekarboxylierung von - Ketoisokaproat in verschiedenen Amnionzelltypen aus Primärkulturen als Funktion des Zellproteins im Test. Mittelwert aus jeweils 3 Parallelbestimmungen. Substratkonzentration: 0,1 mmol/l L - Leucin. Nur Testergebnisse bei Einsatz von mehr als 1 µg Zellprotein

werden gezeigt.

Amnionzellen: ● AF - Zellen, ○ E - Zellen, ◑ F - Zellen;

Fibroblasten: ▲ (klassische Form der Ahornsirupkrankheit);

■ Amnionzellinie von einem Feten mit homozygotem Status für die klassische Ahornsirupkrankheit

---

Gegenüberstellung der spezifischen Dekarboxylierungsrate kultivierter Zellen bei Testung in Suspension und im Monolayer

---

In einer weiteren Untersuchungsreihe wurde die spezifische Aktivität der α - Ketoisokaproat - Dekarboxylierung in verschiedenen Fibroblasten- und Amnionzellinien nach unterschiedlicher Methodik bestimmt. Die Zellinien wurden parallel sowohl in Suspension als auch im Monolayer untersucht. Aus Tabelle 2 geht hervor, daß Fibroblasten weitgehend identische Werte für die spezifische Aktivität unabhängig von der Untersuchungsmethode, aufwiesen. Deutliche Unterschiede fanden sich bei Testung kultivierter Amnionzellen nach beiden Methoden. Die spezifische Dekarboxylierungsrate in einem Amnionzellgemisch, das aus mittelgroßen, konfluenten Primärklonen stammte, betrug bei Testung der Zellen in Suspension direkt aus der Primärkultur nur 10 - 20 % des Wertes, der bei der Testung der gleichen Zellen im Monolayer gemessen wurde. Die spezifische Aktivität der α - Ketoisokaproat - Dekarboxylie-

rung war bei kultivierten Amnionzellen und Fibroblasten gleich groß, wenn die Zellen im intakten Monolayer analysiert wurden.

Tab. 2:

Spezifische Aktivität der α - Ketoisokaproat - Dekarboxylierung in Amnionzellen aus Primärkulturen und Fibroblasten bei Testung der Zellen in Suspension und im Monolayer.

	A: Suspension		B: Monolayer	
	Protein (/ug)	$^{14}CO_2$ (pmol//ug x 3 h)	Protein (/ug)	(pmol//ug x 3 h)
FIBROBLASTEN				
ST	23,9	5,85	23,5	7,79
FM	18,6	3,01	9,4	4,05
BD	14,5	4,23	13,9	4,12
TJ	11,5	2,93	6,3	2,82
AMNIONZELLEN				
962	31,2	0,92	4,6	6,25
965	30,9	0,34	3,2	3,83
966	34,8	0,71	5,6	4,04

Substratkonzentration: 0,1 mmol/l L - Leucin. Testung der Zellen in Mikrotestplatten. Die unterschiedliche Anwachsrate der Zellen nach Trypsinierung wird in der Differenz der Proteinmenge zwischen A und B deutlich.

D I S K U S S I O N :

Amnionzellkulturen enthalten morphologisch unterschiedliche Zelltypen, von denen die E - und die spezifischen AF - Zellen in Kulturen von Hautfibroblasten nicht vorkommen. Nur der selten vertretene F - Zellentyp dürfte mit kultivierten Hautfibroblasten und Fibroblasten von fetaler Haut morphologisch und auch in biochemischer Hinsicht identisch sein (Hoehn et al, 1974). Kultivierte Hautfibroblasten als Prototyp beim Nachweis genetisch bedingter Enzymdefekte werden grundsätzlich bei jeder Pränataldiagnostik herangezogen, und zwar bei der Diagnostik eines homozygoten Enzymmangels bei dem Indexpatienten einer Familie. Die Verwendung ganz unterschiedlichen Zellmaterials (Amnionzellen, Fibroblasten) im "Komplex der Pränataldiagnostik" setzt voraus, daß das Material bezüglich der zu untersuchenden Enzymaktivität verglichen wurde.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, daß

1. kultivierte Hautfibroblasten und gemischte Amnionzellen aus Primärkulturen, jeweils von Normalkontrollen, eine ähnlich hohe spezifische Aktivität der Dekarboxylierung von α - Ketoisokaproat aufwiesen,
2. keine signifikanten Unterschiede in der spezifischen Aktivität der Dekarboxylierung von α - Ketoisokaproat zwischen den hier differenzierten Amnionzelltypen bestand.

Fenson et al (1978) fanden in kultivierten Amnionzellen für die Dakarboxylierung von α- Ketoisokaproat höhere spezifische Aktivitäten als in kultivierten Fibroblasten. Andere Autoren wie Cox et al (1978) und Chuang et al (1981) fanden keine Aktivitätsunterschiede zwischen Fibroblasten und kultivierten Amnionzellen.

Die Zuordnung der Zellen aus Amnionzellprimärkulturen zu drei Zelltypen erfolgte nach den Kriterien von Hoehn et al (1974). Nach den Angaben dieser Autoren lassen sich lichtmikroskopisch drei morphologisch unterschiedliche Amnionzelltypen gegeneinander abgrenzen. Frühere Arbeiten (Melancon und Nadler, 1971; Gerbie et al, 1972) unterschieden nur zwischen epitheloiden und fibroblastoiden Amnionzellen, wobei die fibroblastoiden Zellen sowohl den AF - als auch den F - Zellen von Hoehn et al entsprechen dürften. Sutherland et al (1974) differenzierten in Amnionzellkulturen 5 Zelltypen, von denen einer, die Makrophagen, noch in der Primärkultur degenerierte. Drei epitheloide Zelltypen ließen sich unterschiedlich gut subkultivieren und nur der fibroblasten-ähnliche Zelltyp hatte die gleiche Morphologie wie Fibroblasten aus fetaler Haut. Aspekte der klonalen Heterogenität von Amnionzellkulturen wurden besonders von Schmid (1974) hervorgehoben. Van der Veer et al (1978) beschrieben fünf Zelltypen in Amnionzellprimärkulturen, die sie

getrennt der Analyse lysosomaler Enzyme unterwarfen.

Von 188 untersuchten Primärklonen konnten Hoehn et al (1974) 171 klassifizieren, und zwar ordneten sie 66,5 % der Klone dem AF - Zelltyp, 24,7 % dem E - Zelltyp und nur 8,8 % dem F - Zelltyp zu. In der vorliegenden Arbeit fand sich eine weitgehende Übereinstimmung in der prozentualen Hüfigkeit der Zuordnung der untersuchten Primärklone zu den einzelnen Amnionzelltypen.

Zur biochemischen Differenzierung der Zellinie von Normalkontrollen und Patienten mit der Ahornsirupkrankheit wurde L - [1 - ^{14}C] - Leucin als Substrat eingesetzt. Dabei ist die intrazelluläre, nicht geschwindigkeitslimitierende Transaminierung (Haper et al, 1978) zu [1 - ^{14}C] - α- Ketoisokaproat Voraussetzung für den nachfolgenden und hier zu untersuchenden enzymatischen Schritt der Ketosäuredekarboxylierung. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, daß bei der Verwendung intakter Fibroblasten eine sichere Diskriminierung zwischen Normalkontrollen und Patienten mit Ahornsirupkrankheit nur mit Leucin (oder den anderen beiden verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Isoleucin) als Initialsubstrat, nicht aber bei primärem Einsatz der entsprechenden Ketosäurenanaloge gelang (Wendel

et al, 1975; Dancis et al, 1977).

In Vorversuchen wurde die für den Test optimale Leucin - Konzentration ermittelt. Dabei wurde eine hohe Testempfindlichkeit angestrebt, um den Test mit möglichst wenig Zellmaterial durchführen zu können. Die spezifische Radioaktivität des Substrates wurde möglichst hoch belassen, entsprechend wurde Leucin unterhalb der Sättigungskonzentration für die ersten beiden Schritte im Leucinabbau (Transaminierung und Dekarboxylierung) intakter Zellen von Normalkontrollen eingesetzt. Die Menge an freigesetztem CO_2 war linear mit dem in dem Test eingesetzten Zellprotein korreliert. Bei der Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Reaktion war eine lineare Beziehung zwischen der Dekarboxylierungsrate und der Inkubationszeit während der ersten 90 Minuten nicht gegeben. Die Ursache hierfür blieb ungeklärt. Die fehlende Linearität könnte im zögernden Erreichen der Inkubations-Temperatur von 37^{o} C nach Herstellung des Testansatzes begründet sein. Eine andere Möglichkeit wäre die Absorption freigesetzten Kohlendioxyds im Testgemisch, bis nach Erreichen einer Sättigung weiteres freigesetztes CO_2 in den Luftraum über dem Testansatz entweichen und von den alkalischen Plättchen gebunden werden kann. Um den Test nicht zu komplizieren, wurde auf das Austreiben des im Testgemisch möglicherweise absorbierten CO_2

durch zusätzliches Ansäuren des Testgemisches verzichtet.

Die Untersuchung der Zellen unter diesen Bedingungen hat gezeigt, daß sich die verschiedenen Amnionzelltypen hinsichtlich der Aktivität der ersten zwei Stufen des Leucinabbaus (gemessen als Dekarboxylierung von α - Ketoisokaproat) wie bei den meisten bisher untersuchten Enzymaktivitäten verhielten. Gerbie et al (1972) fanden bei der Untersuchung mit epithelialen und fibroblastoiden Amnionzellen nach mehreren Kulturpassagen nur zwei Zelltypen-spezifische Enzyme: die Histidase kam praktisch nur in epithelialen Zellen vor und die Cystathionin-Synthetase nur in fibroblastoiden Zellen. Die spezifische Aktivität einer Reihe von anderen Enzymen wurde von diesen Autoren für beide Zelltypen etwa gleich hoch gefunden. Auch die Aktivität der Argininosuccinat - Synthetase (Defekt bei der Citrullinämie) war niedrig in Kulturen mit überwiegend epithel-ähnlich wachsenden Amnionzellen und hoch in Kulturen mit überwiegend fibroblasten-ähnlichen Amnionzellen (Jacoby et al, 1981), während die Aktivität des im Harnstoffzyklus nachfolgenden Enzyms, der Argininosuccinat - Lyase (Defekt bei der Argininbernsteinsäure-Krankheit, durch wechselnde Mengen beider Zelltypen in der Amnionzellkultur nicht beeinflußt wurde (Jacoby et al, 1981). Van der Veer et al (1978) fanden keine

wesentlichen Unterschiede in den spezifischen Aktivitäten einiger lysosomaler Enzyme in insgesamt 5 verschiedenen Typenklassen von Amnionzellen aus der Primärkultur.

Cox et al (1978) hatten bei der Pränataldiagnostik der Ahornsirupkrankheit in zwei von 18 Fällen erhebliche Schwierigkeiten, die exakte Diagnose zu stellen. In beiden Fällen mußten schlecht wachsende kultivierte Amnionzellen vom epitheloiden Typ untersucht werden. Diese und andere Autoren (Cox et al, 1978; Elsas et al, 1974) benutzten den ursprünglich für große Zellmengen (über 400.000 Zellen pro Test, Leukozyten, Fibroblasten) entwickelten Test zur Diagnostik der Ahornsirupkrankheit auf Enzymebene (Langenbeck et al, 1971; Dancis et al, 1973) auch bei der Pränataldiagnostik, ungeachtet der Probleme, die die Gewinnung großer Mengen von kultivierten Amnionzellen mit sich bringt.

Das Zeitintervall zwischen Amniozentese und der biochemischen Diagnostik des entsprechenden Enzymdefektes in der Zellkultur ist begrenzt. Besonders epitheloide Amnionzellen haben ein geringes Wachstumspotential und lassen sich nur schlecht innerhalb kurzer Zeit durch Subkultivierung vermehren. Daher sind biochemische Mikrotechniken zur Testung von Zellen, die

direkt aus der Amnionzellkultur stammen, grundsätzlich am besten geeignet. Im Falle der Ahornsirupkrankheit liegt eine sichere Mikrotechnik vor.

Verläßliche Daten für die spezifische Aktivität des hier untersuchten Enzymschrittes in Amnionzellen direkt aus der Primärkultur wurden nur dann erzielt, wenn die Zellen im Monolayer (Mikromethode) analysiert worden wären. Bei Testung der gleichen Zellen in Suspension fand sich eine weit geringere spezifische Enzymaktivität. Kultivierte Hautfibroblasten aus konfluenten Subkulturen wiesen bei Testung nach beiden Methoden etwa identische spezifische Enzymaktivitäten auf. Entsprechend muß die Diskrepanz der Testergebnisse mit Amnionzellen auf Eigenarten der Amnionzellprimärkultur zurückgeführt werden.

Primärkulturen und frühe Subkulturen von Amnionzellen zeigen klonales Wachstum. Die Klone enthalten zum Teil viele, nicht mehr replikative und wohl auch metabolisch inaktive Zellen, meist in den Zentren gelegen. Der Anteil an inaktiven Zellen wird besonders groß in älteren Primärkulturen mit Ausbildung von Megaklonen (Hoehn et al, 1974). Hingegen ist der Anteil metabolisch intakter Zellen relativ groß in noch jungen Primärkulturen oder aber nach häufiger und regelmäßiger Subkultivierung der Amnionzellen. Die vorliegenden Er-

gebnisse zeigen, daß bei der biochemischen Diagnostik mit Amnionzellen aus der Primärkultur oder einer frühen Subkultur unbedingt der metabolische Zustand der Zellen kontrolliert werden muß.

Biochemische Untersuchungen in Fibroblasten werden gewöhnlich erst dann durchgeführt, wenn gleichförmige Zellen vorhanden sind, die aus stark konfluenten Subkulturen stammen. Klonales Wachstum spielt hier keine Rolle. Amnionzellen erreichen dieses Stadium des Wachstums, wenn überhaupt, nur nach mehrfachen, sehr zeitraubenden Subkultivierungen (Elsas et al, 1974).

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß die Mikrotechnik zur Messung der Dekarboxylierungsrate von α - Ketoisokaproat in jeder Wachstumsphase eine direkte Untersuchung von Amnionzellen aus Primär- oder Subkulturen erlaubt. Durch die der biochemischen Untersuchung vorangestellte einmalige Subkultivierung der Zellen in die Mikrotestplatten und das anschliessende mehrfache Spülen mit physiologischer Kochsalzlösung gelangt nur der festhaftende Zellrasen zur biochemischen Untersuchung. Totes und metabolisch inaktives Zellmaterial wird vorher entfernt. Die Ergebnisse zeigen, daß diese Technik exakte Daten für die spezifische α - Ketoisokaproat - Dekarboxylierung (mit Leucin als Ausgangssubstrat) liefert - auch ohne vor-

herige Testung der Vitalität der Zellen.

Diese Mikromethode ist sehr zuverlässig, und sie ist unabhängig von dem vorherrschenden Zelltyp der Amnionzellen einsetzbar.

Literaturliste:

1. Ampola M.G., Mahoney M.J., Nakamura E., Tanaka K.:
Prenatal treatment of a patient with vitamin B_{12} responsive methylmalonic aciduria
N Engl J Med 293: 313 - 317, (1975)

2. Blumberg B.D., Globus M.S., Hanson K.H.
The psychological sequelae of abortion performed for a genetic indication
American Journal of Obstetrics and Gynecology 122, No. 7: S. 799 ff., (1975)

3. Chuang D.T., Niu W.L., Cox R.P.
Activities of branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase and its components in skin fibroblasts from normal and classical-maple-syrup-urine-disease subjects
Biochem. J. 200: 59 - 67, (1981)

4. Christensen E., Brock Jacobsen B., Gregersen N., Hjeds H., Pedersen J.B., Brandt N.J., Baekmark U.B.,
Urinary excretion of succinylacetone and δ-amino-levulinic acid in patients with hereditary tyrosinemia
Clinica Chimica Acta 116: 331 - 341, (1981)

5. Clow C.L., Reade T.M., Scriver C.R.:
Outcome of early and longterm management of classical-maple-syrup-urine-disease
Pediatr. 68: 856 - 862, (1981)

6. Cox R.P., Hutzler J., Dancis J.:
Antenatal diagnosis of maple-syrup-urine-disease.
Lancet II: 212, (1978)

7. Dancis J., Hutzler J., Cox R.P.:
Evaluation of amino acid metabolism in maple-syrup-urine-disease. In: Tissue culture, methods and applications. Eds.: Kruse P.F., a. M.K. Patterson. JR. Academic press, New York, (1973) pp. 639 - 643.

8. Dancis J., Hutzler J., Cox R.P.:
Maple-syrup-urine-disease: Branched-chain keto acid decarboxylation in fibroblasts as measured with amino acids and ketoacids.
Am. J. Hum. Genet. 29: 272 - 279, (1977)

9. Dancis J., Hutzler J., Levitz M.:
Metabolism of the white blood cells in maple-syrup-urine-disease.
Biochim. Biophys. Acta 43: 342 - 343, (1960)

10. Dancis J., Hutzler J., Levitz M.:
Tissue distribution of branched chain ketoacid decarboxylase.
Biochim. Biophys. Acta 52: 60 - 64, (1961)

11. Dancis J., Hutzler J., Snyderman S.E., Cox R.P.:
Enzyme activity in classical and variant forms of maple-syrup-urine-disease.
J. Pediat. 81: 312 - 320, (1972)

12. Deutsche Forschungsgemeinschaft
Pränatale Diagnostik Genetisch Bedingter Defekte
16. Informationsblatt, (1982)

13. Diernaes E., Filtenb[illegible] J.A., Kesch E.,
Three years experience with prenatal diagnostic in a danish county
Lancet II, 1044 - 1045, (1982)

14. Dreyfus P.M., Prensky A.L.:
Further observations on the biochemical lesion in maple-syrup-urine-disease.
Nature 214: 276, (1967)

15. Elsas L.J., Priest J.H., Wheeler F.B., Danner D.J., Pask B.A.:
Maple-syrup-urine-disease: Coenzyme function and prenatal monitoring
Metabolism 23: 569 - 579, (1974)

16. Emery AEH:
Antenatal diagnosis of genetic disease
Modern trends in Human Genetics, vol 1, edited by Emery AEH, New York, Appleton-Century Crofts, pp 267 - 296, (1970)

17. Fensom A.H., Benson P.F., Baker J.A.:
A rapid method for assay of branched-chain keto acid decarboxylation in cultures cells and its application to prenatal diagnosis of maple-syrup-urine-disease.
Clin. Chim. Acta 87: 169 - 174, (1978)

18. Galjaard H.
Genetic Metabolic Disease
Elsevier, North Holland, (1980)

19. Gaull G.E., Tallan H.H., Laijtha A., Rassin D.K.:
Pathogenesis of brain dysfunction in inborn errors of amino acid metabolism. In: Biology of brain dysfunction. Vol. 3. Ed.: Gaull G.E., Plenum, New York, London, (1975) pp. 47 - 143.

20. Gerbie A.B., Melancon S.B., Ryan C., Nadler H.L.,
Cultivated epithelial - like cells and fribroblast from amniotic fluid: Their relationship to enzymatic and cytologic analysis
Am. J. Obstet. Gynecol., 114: 314 - 320, (1972)

21. Golbus M.S., Loughman W.D., Epstein C.J., Halbasch G., Stephens J.D., Hall B.D., Prenatal Genetic Diagnosis in 3000 Amniocentesis N. Eng. Journal of Medicine 300: 157 - 163, (1979)

22. Goodman S.I., Gallegos D.A., Pullin C.J., Halpern B. Truscott R.J.W., Wise G., Wilcken B., Ryan E.D., Whelen D.T. Antenatal Diagnosis of Glutaric Acidemia Am. J. Hum. Genet 32: 695 - 699, (1980)

23. Hammersen G., Wille L., Schmidt H., Lutz P., Bickel H.: Maple-syrup-urine-disease: Treatment of the acutely ill newborn. Eur. J. Pediatr. 129: 157 - 165, (1978)

24. Harper A.E., Zapalowski C.: Interorgan relationsship in the metabolism of the branched-chain amino and -Ketoacids. In metabolism and clinical complications of branched-chain amino und -ketoacids Herausgeber: Walser, Williamson; Elsevier, (1981), S. 195

25. Hoehn H., Bryant E.M., Karp L.E., Martin G.M.: Cultivated cells from diagnostic amniocentesis in second trimester pregnancies. I. Clonal morphology and growth potential. Pediat. Res. 8: 746 - 754, (1974)

26. Jacobs C., Solem E., Ek J., Halvorsen K., Jellum E.: Investigation of the metabolic pattern in maple-syrup-urine-disease by means of glass capillary gaschromatography and mass spectrometry J. Chromatolog. 143: 31 - 38, (1977)

27. Jacoby L.B., Shih V.E., Struckmeyer C., Niermeijer M.F., Boué J.,
Variation in argininosuccinate synthetase activity in amniotic fluid cell cultures: implications for prenatal diagnosis of citrullinemia
Clin. Chimica Acta. 116: 1 - 7, (1981)

28. Lancaster G., Mamer O.A., Scriver C.R.:
Branched-chain alpha -keto acids isolated as oxime derivatives: Relationship to the correspondig hydroxy acids and amino acids in maple-syrup-urine-disease.
Metabolism 23: 257 - 265, (1974)

29. Langenbeck U., Rüdiger H.W., Schulze-Schencking M., Keller W., Brackertz D., Goedde H.W.:
Evaluation of a heterozygote test for maple-syrup-urine-disease in leucocytes and cultured fibroblasts.
Humangenetik 11: 304 - 315, (1971)

30. Langenbeck U., Wendel U., Mench-Hoinowski A., Kuschel D., Becker K., Przyrembel H., Bremer H.J.:
Correlations between branched-chain amino acids and branched-chain α-keto acids in blood in maple-syrup-urine-disease.
Clin. Chim. Acta 88: 283 - 291, (1978)

31. Littlefield J.W.: Foreword in Milunsky:
The prental diagnosis of herditary disorders,
Thomas, Springfield, (1973)

32. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr L.A., Randall R.J.,
Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent
J. Biol. Chem. 193: 265, (1951)

33. Melancon S.B., Lee S.Y., Nadler H.L.:
Histidase activity in cultivated human amniotic fluid cells
Science 173: 627, (1971)

34. Milunsky: The prenatal diagnosis of hereditary disoders
Thomas, Springfield, (1973)

35. Morrow III G., Revsin B., Lebowitz J., Britt W., Giles H.:
Detection of Errors in Methylmalonyl-CoA Metabolism by Using Amniotic Fluid
Clinical Chemistry 23: 791, (1977)

36. Murken J.D., Stengel-Rutkowski S.:
Pränatale Diagnostik, Enke, (1978)

37. Schmid W.:
Die pränatale Diagnose von Chromosomenanomalien
Triangel 11: 91, (1972)

38. Scriver C.:
Für das "Comittee for improvement of hereditary disease management. Management of maple-syrup-urine-disease in Canada."
Can. Med. Assoc. Y 115: 1805, (1975)

39. Squire J.A., Nauth L., Ridler M.A.C., Sutton S., Timberlake C.:
Prenatal Diagnosis and Outcome of Pregnancy in 2036 Women Investigated bv Amniocentesis
Hum. Genet. 61: 215 - 222, (1982)

40. Sutherland G.R., Bauld R., Bain A.D.:
Observations on human amniotic fluid cell strains in serial culture
J. Med. Genet. 11: 190 - 195, (1974)

41. Sweetman L., Weyler W., Shafai T., Young P.E., Nyhan W.L.
Prenatal Diagnosis of Propionic Acidemia
JAMA, 242: 1048 - 1052, (1979)

42. Wendel U., Wentrup H., Rüdiger H.W.:
Maple-syrup-urine-disease: Analysis of branched-chain ketoacid decarboxylation in cultured fibroblasts.
Pediat. Res. 9: 709 - 717, (1975)

43. Wendel U., Wöhler W., Goedde H.W., Langenbeck U., Passarge E., Rüdiger H.W.:
Rapid diagnosis of maple-syrup-urine-disease (branched-chain ketoaciduria) by micro-enzyme assay in leukocytes and fibroblasts.
Clin. Chim. Acta 45: 433 - 440, (1973)

44. Westall R.G., Dancis J., Miller S.:
Maple-sugar-urine-disease.
Amer J. Dis. Child. 94: 571 - 572, (1957

45. Van der Veer E., Kleijer W.J., De Josselin de Jong J.E., Galjaard H.
Lysosomal enzyme activities in different of amniotic fluid cells measured by microchemical methods, combined with interference microscopy
Hum. Genet. 40: 285 - 292, (1978)

Zusammenfassung:

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Mikromethode zur Pränataldiagnostik der Ahornsirupkrankheit (Leucinose) in kultivierten Amnionzellen verfeinert und auf ihre Sicherheit überprüft.

Amnionzell-Primärkulturen enthalten Zellen unterschiedlichen Typs, die hinsichtlich der spezifischen Aktivität einiger Enzyme differieren. Dadurch ist bei der Pränataldiagnostik basierend auf Enzymanalyse grundsätzlich die Gefahr einer fehlerhaften Diagnose gegeben, wenn ein Zelltyp in der Kultur überwiegt. Um diese Gefahr bei der Diagnostik der Ahornsirupkrankheit abschätzen zu können, wurde die spezifische Aktivität der oxidativen Dekaboxylierung von α - Ketoisocaproat - dem bei dieser erblich bedingten Stoffwechselkrankheit defekten Enzymschritt - in verschiedenen Amnionzelltypen bestimmt.

Bei der Zuordnung der Zellen zu insgesamt 3 Typen (AF-, F- und E-Zelltyp) wurden die Kriterien von Hoehn et al, (1974) zugrundegelegt. In der vorliegenden Arbeit fand sich eine weitgehende Übereinstimmung in der prozentualen Häufigkeit der Zuordnung der untersuchten Primärklone zu den einzelnen Amnionzelltypen mit den Daten von Hoehn et al.

Die differenzierten 3 Amnionzelltypen von Normalkontrollen

unterschieden sich nicht signifikant voneinander in ihrer spezifischen Aktivität der Dekarboxylierung von α - Keto-isocaproat. In jedem Falle ließen sich Amnionzellen von Normalkontrollen sicher von kultivierten Amnionzellen eines hormozygoten Genträgers für Ahornsirupkrankheit abgrenzen, und das bereits bei Einsatz von nur 1 /ug Zellprotein (entsprechend 1000 - 2000 Zellen) in dem Test.

Außerdem wurde gezeigt, daß bei Messung der Dekarboxylierung in Zellen im Monolayer im Gegensatz zum herkömmlichen Test in Suspension metabolisch inaktive Zellen eliminiert sind. Solche metabolisch inaktive Zellen finden sich vorwiegend in den Zentren von Klonen von Amnionzellprimärkulturen oder frühen Subkulturen. Mit der Mikrotestmethode (Testung der Zellen im Monolayer) lassen sich somit, abgesehen von der sehr viel geringeren benötigten Zellmenge, verläßliche Resultate mit Zellen direkt aus der Primärkultur, ohne zusätzliche Untersuchung ihres metabolischen Zustandes, erzielen.

L e b e n s l a u f

Am 1. Mai 1952 wurde ich, Gerfried Gamm, als Sohn des Kaufmanns Oskar Gamm und seiner Ehefrau, der Ärztin Dr. Maria Gamm, geb. Hübner, in Gütersloh geboren.

Ostern 1958 wurde ich in Gütersloh eingeschult. Nach Abschluß der Realschule 1968 begann ich 1969 eine Banklehre bei der Sparkasse Gütersloh, die ich 1972 abschloß. Von 1973 an besuchte ich das Overberg-Kolleg in Münster, wo ich im Juli 1975 die Reifeprüfung ablegte.

Zum Sommersemester 1976 nahm ich an der Universität Düsseldorf das Studium der Medizin auf. Am 26. April 1982 legte ich in Krefeld den Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab.

Zur Zeit leiste ich meinen Zivildienst als Arzt in der Unfallchirurgischen Klinik der Städtischen Krankenanstalten Bielefeld-Mitte ab.